

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 227–234

Kritische Anmerkungen zur Auswertung von Rezeptoranalysen

Von E. Kuss

I. Frauenklinik der Universität München

(Eingegangen am 6. Februar 1982)

Zusammenfassung: Unter Berücksichtigung der wichtigsten neueren Literatur wird über die Datenverarbeitung im Rahmen der Bindungsanalysen berichtet. Aus den Grundlagen der Bindungstheorie und Informationstheorie werden für die Praxis Schlußfolgerungen zur korrekten Bestimmung von Assoziationskonstanten und Bindungsstellen-Konzentrationen abgeleitet. Die Minimierung von Fehlern wird als Funktion der Sättigung des am stärksten verdünnten Reaktionspartners betrachtet. Es wird auf die verschiedenen Möglichkeiten zur graphischen Darstellung der Bindungsfunktion hingewiesen und auf die Fehler, die sich aus mathematisch äquivalenten Umformungen der Bindungsthermie entwickeln. Zur Parameter-Anpassung wird auf verschiedene heuristische Modelle von Bindungs-Reaktionen verwiesen und es wird empfohlen, von der praktisch generell anwendbaren *Adair*-Funktion auszugehen. Im Falle elektronischer Datenverarbeitung müssen gut definierte Kriterien für die Qualität der Anpassung vorgegeben sein. Die tatsächlich erreichte Qualität der Anpassung muß charakterisiert werden. Es wird auf häufig begangene, jedoch vermeidbare Fehler verwiesen.

Critical comments on the calculation of receptor analyses

Summary: The main literature concerning the processing of binding data is reviewed. Practical conclusions for the measurement of association constants and binding site concentrations are considered from the standpoint of basic binding theory in connection with basic information theory. The theoretical minimum errors in the association constant and the binding site concentration are discussed as a function of the saturation fraction of the most dilute component. Various plotting forms and the error arising from various rearrangements of the basic binding equation are discussed. For fitting procedure several heuristic models are mentioned and it is recommended to start from the most general *Adair* function. The necessity of well defined criteria for quality of fit in computer programming for iterative curve fitting procedures is emphasized. The most frequent, however avoidable, errors are mentioned.

Einführung

Rezeptoranalysen gehören zu den Titrationsverfahren der analytischen Chemie. Die einfachsten Beispiele werden idealisiert wie folgt beschrieben: Der eine Reaktionspartner Q („Binder“, „Rezeptor“) mit der unbekannten fixierten Menge q an voneinander unabhängigen Bindungsstellen im Reaktionsvolumen wird durch Zugabe bekannter variabler Mengen p an unabhängigen Bindungsstellen seines Reaktionspartners P („Ligand“, „Hormon“, „Pharmakon“) titriert. Kommt es zur reversiblen Assoziationsreaktion $P + Q \rightleftharpoons PQ$, so verteilt sich q auf die Zustände Q und PQ und p auf die Zustände P und PQ. Am Ende der Reaktion haben sich die Gleichgewichtskonzentrationen $[P]$ und $[Q]$ der „freien“ und $[PQ]$ der „gebundenen“ Reaktionspartner eingestellt, deren Relation durch das Massenerhaltungsgesetz (Gl. 1) und durch das Massenwirkungsgesetz (Gl. 2) für bimolekulare Reaktionen definiert ist.

Die Liganden werden zumeist in leicht meßbarer Form als „markierte“ Verbindungen, häufig als radioaktive Verbindungen mit bekannter spezifischer Aktivität (Bq/mol), eingesetzt. Deren als Meßgrößen herangezogene Konzentrationen werden ggf. in Analogie zu Gl. 1a mit $p^* = P^* + P^*Q$ charakterisiert, oder auch mit $T^* = F^* + B^*$ („total“, „free“, „bound“); ($p = T$, ggf. auch $p + p^* = T$, $P = F$, $PQ = B$) (1, 2).

$$p = P + PQ \quad (\text{Gl. 1a})$$

$$q = Q + PQ \quad (\text{Gl. 1b})$$

$$\frac{[PQ]}{[P][Q]} \equiv K = \frac{B}{F(q - B)} \quad (\text{Gl. 2})$$

$$\frac{B}{q} = \frac{KF}{1 + KF} \equiv r; \quad 0 \leq r \leq 1; \quad p > q \quad (\text{Gl. 2a})$$

$$r/F = -Kr + K; \quad B/F = -KB + Kq \quad (\text{Gl. 2b})$$

$$\frac{B}{T} = \frac{(KT + Kq + 1) - [(KT + Kq + 1)^2 - 4K^2 qT]^{1/2}}{2KT} \quad (\text{Gl. 2c})$$

Der Sättigungsgrad r charakterisiert das System vollständig, wenn p und q bekannt sind, da $P = p - rq$ und $Q = (1 - r)q$. Der Sättigungsgrad r charakterisiert auch die Wahrscheinlichkeit der Bindung und mit $1 - r$ die Wahrscheinlichkeit der Nicht-Bindung des Rezeptors. Die Quotienten PQ/p bzw. $1 - PQ/p$ charakterisieren diese beiden Wahrscheinlichkeiten für den Liganden; sie werden eingesetzt, wenn $p < q$.

Nach der Informationstheorie ergibt sich aus den beiden Wahrscheinlichkeiten für „Bindung“ und für „Nicht-Bindung“ der Informationsgehalt I von r (Gl. 3; $I(r)$ in „bits“, wenn für L der Wert $(\ln 2)^{-1}$ eingesetzt wird).

$$I(r) = -L[r \ln r + (1 - r) \ln (1 - r)] \quad (\text{Gl. 3})$$

Liegen N Werte von r vor, die sich signifikant voneinander unterscheiden, so ist die Gesamtinformation gleich der Summe der Einzelinformationen. Die maximale Information I_{\max} ist dann erreicht, wenn N die Menge aller sinnvollen und zugänglichen Werte von r umfaßt und den gesamten Bereich von r in äquidistante r -Werte mit Intervallen der Länge dr einteilt

$$I_{(N)} = \sum_{i=1}^{i=N} I_{r_i} = \int_0^1 I(r) dr$$

$$I_{\max} = \sum_{i=1}^N I_{r_i} = \int_0^1 I_{r_i} dr \quad (\text{Gl. 4})$$

Die Relation aktuelle Information/Maximalinformation akkumuliert beim Übergang von $r = 0$ zu einem beliebigen Wert $r = r_i$

$$I/I_{\max} = r - r^2 \ln r + (1 - r)^2 \ln (1 - r) \quad (\text{Gl. 5})$$

oder, auf r normiert, (Gl. 6)

$$I/I_{\max} r = 1 - r \ln r + r^{-1} (1 - r)^2 \ln (1 - r). \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Funktionen Gl. 3, Gl. 5 und Gl. 6 sind in Abbildung 1 graphisch dargestellt (3, 4).

Für die Praxis ergeben sich aus den Gleichungen im folgenden beschriebene Konsequenzen für

- I. Versuchsplanung
- II. Meßwertverarbeitung
- III. Auswertung

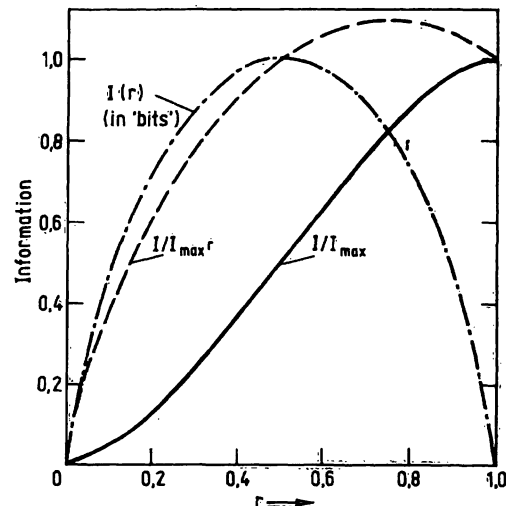


Abb. 1. Graphische Darstellung der Funktionen Gl. 3, Gl. 5 und Gl. 6.
a) Information $I(r)$ als Funktion von r (gestrichelte Kurve)
b) Akkumulierte Information relativ zur Maximalinformation (I/I_{\max}) wenn r von 0–1 ansteigt (durchgezogene Kurve)
c) Rate der akkumulierten Information ($I/I_{\max} r$), wenn r von 0–1 ansteigt (gestrichelte Kurve).
(s. a. l. c. (3, 4))

I. Versuchsplanung

1. Die Konzentrationen des Binders und des Liganden sollten bei etwa $1/K$ liegen

Für die Datenverarbeitung wird angestrebt, daß der Quotient B/F bei etwa 1 liegt; liegt er, wie nicht selten publiziert wird, bei 10^3 oder 10^{-3} , so wirken sich kleine Meßfehler sehr viel stärker aus. Nach Gl. 2 ist abzuleiten, daß B/F -Werte um 1 mit q -Werten um $1/K$ leicht zu erreichen sind (5). Schwierigkeiten ergeben sich bei Reaktionspartnern mit extrem hohen K -Werten u.a. deswegen, weil p^* bei der üblichen spezifischen Aktivität im gesamten Sättigungsbereich r unter der Nachweisgrenze liegen kann. Außerdem ist zu beachten, daß bei relativ hoher Affinität und/oder Konzentration des Rezeptors erst nach Zusatz größerer Mengen des Liganden der Bereich verlassen wird, in dem der Ligand stöchiometrisch an den Rezeptor gebunden wird (ggf. horizontaler Ast am Kurvenbeginn des *Scatchard*-Diagrammes $r/F = f(r)$ bzw. $B/F = f(B)$) und der Bereich erreicht wird, in dem meßbare Konzentrationen an freien Liganden vorliegen. Erst in diesem Bereich ist der Formalismus für Gleichgewichtsreaktionen anwendbar. Im Bereich stöchiometrischer Addition liegt die Wahrscheinlichkeit der Bindung mit PQ/p bei 1. Nach Gl. 3 wird die Information $I(r) = 0$, wenn die Wahrscheinlichkeit der Bindung 1 oder 0 beträgt. Im Bereich der stöchiometrischen Addition kann also keine Information gewonnen werden (4–6).

2. r-Werte

sollen oberhalb des Bereiches $0 \leq r \leq 0,1$ liegen
r-Werte im Bereich $0 \leq r \leq 0,1$ umfassen bereits 10% des Gesamtbereiches von r, ergeben aber nur 4% des Informationsmaximums. In diesem engen Sättigungsbereich kann die Relation der Meßdaten zueinander nicht als repräsentativ für den gesamten Bereich von r gelten. Es besteht die Möglichkeit, in diesem Bereich für „nearly any function, no matter how wild“ fälschlicherweise eine lineare Anordnung der Meßdaten zu erkennen. Die Meßdaten dieses Bereiches dürfen aber nicht soweit vernachlässigt werden, daß der Bindungsbereich eines zusätzlichen Binders q' mit höheren Affinitäten übersehen wird (3, 4, 7).

3. r-Werte

sollen im Bereich $0,2 \leq r \leq 0,8$ liegen

Nach Gl. 3 liegt das Maximum für $I(r) = f(r)$ bei $r = 0,5$. Nach Gl. 6 wird im Bereich $r = 0$ bis $r = 0,76$ das Optimum der Akkumulation von Information, nämlich 83% der Gesamtinformation, erreicht. Es ist davon auszugehen, daß etwa 75% der Sättigungskurve definiert sein muß, bevor die Daten tatsächlich als repräsentativ für das untersuchte System angesehen werden können. Auch nach Gl. 5 wird offensichtlich, daß zwischen $0 \leq r \leq 0,2$ und $0,8 \leq r \leq 1,0$ die Funktion nur sehr flach ansteigt, d.h., daß in diesem Bereich der Informationszugewinn gering ist.

Der relative Fehler von K wird durch $\Delta K/K = \Delta r [1/r^2 + 1/(1-r^2)]^{1/2}$, der relative Fehler von q wird durch $\Delta q/q = \Delta r (2/r)^{1/2}$ beschrieben. Diese Funktionen zeigen, daß zwar für q der Fehler bei $r = 1$ minimal wird, daß aber in diesem Bereich der Fehler von K unendlich groß wird. Für $r < 0,2$ werden die relativen Fehler von K und q sehr groß. Auch nach dieser Betrachtungsweise ist zu schließen, daß für die Bestimmung von K und q der Bereich zwischen $r = 0,2$ und $r = 0,8$ zu empfehlen ist (3, 4, 7).

4. Die Anzahl der äquidistanten r-Werte

soll $N = 1/2 s_r$ betragen und möglichst hoch sein

Der in Gl. 4 definierten maximalen Information kann in der Praxis nicht durch Erhöhung der Anzahl der Messun-

gen beliebig nahe gekommen werden. Die Menge aller zugänglichen sinnvollen Informationen wird durch den Fehler begrenzt, mit dem r bestimmt werden kann. Zwei Werte von r müssen sich signifikant voneinander unterscheiden; als Signifikanzschranke wird im allgemeinen gewählt $r_{i+1} - r_i = 2s_r$, d.h. die Differenz zweier Werte von r muß größer sein als die doppelte Standardabweichung von r. Die maximale Information ist also umso größer, je präziser die Werte von r bestimmt werden können. Für das 2 Parameter-Problem (Gl. 2b), Bestimmung von r und K, wird $N = 10$ als Minimum angegeben (1, 3, 4).

II. Meßwertverarbeitung

Ziel der Meßwertverarbeitung in der Rezeptoranalyse ist, aus den Titrationskurven Informationen über die Gleichgewichtsparameter der Adsorptionsisotherme zu gewinnen. Nach Gl. 2 handelt es sich im einfachsten Fall darum, Zahlenwerte für q und K zu ermitteln. Von den zahlreichen algebraisch äquivalenten Umformungen der Hyperbelgleichung (Gl. 2), die der *Michaelis-Menten*-Gleichung der Enzymologie entspricht, sind besonders die drei zu linearen Funktionen führenden Transformationen unter folgenden Namen bekannt:

Benesi-Hildebrand: $1/B = f(1/F)$

(Enzymologie: *Lineweaver-Burk*, „doppelt reziprok“);

Wolf-Scott: $F/B = f(F)$

(Enzymologie: *Hanes*, „einfach reziprok“);

Scatchard: $r/F = f(r)$ bzw. $B/F = f(B)$ (Gl. 2b), (Abb. 2) (Enzymologie: *Eadie-Hofstee*).

Die drei linearen Transformationen werden besonders deswegen bevorzugt angewandt, weil

1. die Ausgleichskurve, mit der die gesuchten Parameter K und q anfallen, u.U. leicht zugänglich ist, sei es graphisch mit Hilfe eines Lineals oder rechnerisch mit Hilfe der linearen Regression der „kleinsten Fehlerquadrate“;
2. die Abweichung der Ausgleichskurve von der Linearität unmittelbar anzeigt, daß die untersuchte Reaktion nicht dem durch Gl. 2 charakterisierten Modell entspricht:

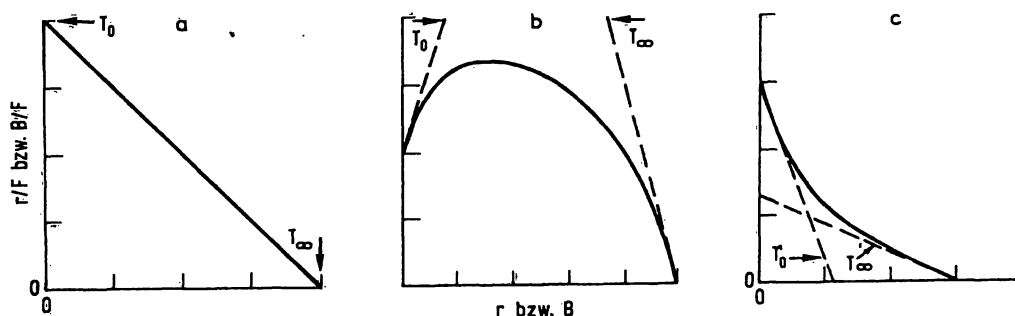


Abb. 2. *Scatchard*-Diagramme mit Graph und Tangenten T_0 und T_∞ .

a) linearer Graph b) konvexer Graph c) konkaver Graph (s. a. z. B. l. c. (1, 4, 15–17, 35)).

entweder, weil die gemessenen Konzentrationen nicht den Gleichgewichtskonzentrationen entsprachen, da entweder das Gleichgewicht noch nicht erreicht oder Fehler, z. B. bei der Trennung der Komponenten gemacht wurden (Mißklassifikation),

oder, weil die beobachtete Reaktion erheblich von dem Modell abweicht, das der Gl. 2 zugrunde gelegt wurde.

Die drei linearen Transformationen der Adsorptionsisotherme (Gl. 2) sind zwar algebraisch äquivalent, geben jedoch beim Einsetzen realer Meßdaten (z. B. für P, PQ) unterschiedliche Werte für die gesuchten Parameter (z. B. für K, q), weil die Meßfehler in Abhängigkeit von ihren Strukturen unterschiedlich stark eingehen.

Im *Benesi-Hildebrand*- und im *Woolf-Scott*-Diagramm finden die Titrationskurven keine Grenzen auf der Abszisse. Dies verleitet dazu, irgendeinen, gegebenenfalls sehr engen Ausschnitt des Sättigungsbereiches als repräsentativ darzustellen und, da Linearität angenommen wird, bedenkenlos zu extrapolieren. In der *Benesi-Hildebrand*-Transformation werden bei hohen P-Werten die Daten für $1/P$ stark komprimiert. Dies bedeutet, daß niedrige P-Werte, die mit geringer Präzision ermittelt werden, mit mehrfachem Gewicht in die lineare Regression eingehen als die präziser bestimmten höheren P-Werte. Dies bedeutet auch, daß die nur bei hoher Ligandenkonzentration meßbare sogenannte „unspezifische Bindung“, die im Diagramm nahe dem 0-Punkt plaziert ist, nicht als Abweichung von der Linearität erkannt wird, obwohl in diesen Fällen die Voraussetzungen für das der Berechnung zugrunde liegende 1:1 Modell nicht mehr erfüllt sind.

Im *Scatchard*-Diagramm (Gl. 2b, $r/F = f(r)$ (Abb. 2), zumeist aber in der Form $B/F = f(B)$), finden die Titrationskurven ihre Grenzen an den Grenzen des ersten Quadranten. Sie beginnen und enden bei $\lim_{F \rightarrow 0} (r/F)$ und bei $\lim_{F \rightarrow \infty} r$.

Auf der Abszisse wird somit der gesamte Sättigungsbereich linear wiedergegeben, auch wenn B aufgetragen wird und erst sekundär q ermittelt und die Abszisse nachträglich auf r normiert wird.

Als Nachteil der Meßwertverarbeitung nach *Scatchard* gilt die Tatsache, daß nicht nur die „abhängige“ Variable r/F bzw. B/F , sondern daß auch die „unabhängige“ Variable $r = B/q$ bzw. B mit Meßfehlern behaftet ist und daß die Fehler der abhängigen Variablen und die der unabhängigen Variablen miteinander korrelieren (bei falsch hohem B/F wird auch falsch hohes B erhalten und umgekehrt). Daraus folgt, daß die Fehler weder in der horizontalen noch in der vertikalen Achse des Diagramms normal verteilt sind. Deshalb können auf Normalverteilung basierende statistische Berechnungen, z. B. lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, zu falschen Ergebnissen führen (1, 4, 8).

Im *Eisenthal*- und *Cornish-Bowden*-Diagramm können K und q über Funktionen ermittelt werden, die den

obengenannten drei linearen Transformationen der Adsorptionsisotherme mathematisch äquivalent sind. Mit dieser Art der Meßwertverarbeitung kann jedoch der Vertrauensbereich der ermittelten Parameter abgeschätzt werden, ohne daß Annahmen über die Verteilung der Meßfehler gemacht werden müssen (8).¹

Die mit den linearen Transformationen der Adsorptionsisotherme in Kauf genommene Fehlerhaftigkeit der Abszissenwerte kann dadurch vermieden werden (d. h. sie kann in Relation zur Fehlerhaftigkeit der Ordinatenwerte vernachlässigt werden), daß die Adsorptionsisotherme in der Form $B = f(T)$ oder $B/T = f(T)$ aufgetragen wird (Gl. 2c), da T mit beliebiger Präzision bestimmt werden kann ($B/T = \frac{B/F}{1 + B/F}$). Zur Berechnung der Para-

meter K und q liegen EDV-Programme für nichtlineare Regressionen vor. In der formal gleichartigen Analyse der Enzymkinetik kann die Konzentration des „freien“ Substrates der Gesamtmenge an Substrat pro Volumeneinheit im allgemeinen gleichgesetzt werden, da die eingesetzte Menge an Substrat zumeist um einige Zehnerpotenzen größer ist als die eingesetzte Menge des Enzyms. In der Rezeptoranalytik darf die Konzentration des „freien“ Liganden P nicht der Gesamtmenge p bzw. $T = PQ + P$ des Liganden pro Ansatz gleichgesetzt werden, da etwa gleich große Mengen Ligand und Rezeptor eingesetzt werden. Hieraus resultiert u. a., daß beim Auftragen von B als Funktion von T die Halbsättigung, die beim Abszissenwert $1/K + q/2$ liegt, nicht der Dissoziationskonstanten gleichgesetzt werden darf. Analoges gilt für die Charakterisierung von Kompetitoren der Bindungsreaktion. Es ist im allgemeinen nicht zulässig, die Gesamtmenge des Kompetitors im Reaktionsansatz der Konzentration des „freien“ Kompetitors gleichzusetzen, wie es im allgemeinen in der Enzymkinetik üblich ist, z. B. bei der Meßwertverarbeitung im *Dixon*-Diagramm (1, 8). Da aber andererseits die Auswertung der Funktion $B = f(T)$ auf größere Schwierigkeiten stoßen kann als die Auswertung der *Scatchard*-Funktion, wird vorgeschlagen, die Meßwerte zunächst im Diagramm $B = f(T)$ anzuordnen und die dadurch ermittelten Funktionswerte in das *Scatchard*-Diagramm $B/F = f(B)$ zur endgültigen Auswertung einzutragen (1, 9).

Die Meßwerte der Rezeptoranalytik werden am häufigsten im *Scatchard*-Diagramm ausgewertet. Es liegen jedoch nur wenige empirische Untersuchungen über die Vor- und Nachteile der linearen Transformationen in der Rezeptoranalytik vor. Die divergierenden Ergebnisse sind möglicherweise Folgen unterschiedlicher Fehlerstrukturen in den Ansätzen (10–14).

III. Auswertung von *Scatchard*-Funktionen

Ein gegebener Satz von Meßdaten kann näherungsweise durch zahlreiche Funktionen beschrieben werden, die entweder von definierten physikalisch-chemischen Reaktionsmodellen abgeleitet wurden oder rein mathema-

tisch-statistische Regressions- oder Interpolationsmethoden darstellen (Spline-Funktionen, Polynome). Gewisse Funktionen lassen sich nicht explicit, sondern nur durch iterative Rechenverfahren mit Hilfe der EDV lösen. Selbst optimale Übereinstimmung von Funktion und Meßdaten beweist nicht zwingend die Übereinstimmung der den Funktionen zugrundeliegenden Modellvorstellung mit dem untersuchten realen System.

Zur Auswertung der Meßdaten einer Rezeptor-Analyse werden zunächst die Tangenten T_0 und T_∞ des *Scatchard*-Graphen bei $\lim_{F \rightarrow 0} (r/F)$ bzw. $\lim_{F \rightarrow \infty} (r)$ konstruiert, ggf.

berechnet. Entweder die Tangenten fallen mit dem *Scatchard*-Graphen zusammen (linearer *Scatchard*-Graph) oder sie fallen nicht zusammen (nicht-linearer *Scatchard*-Graph) (Abb. 2).

1. Auswertung linearer *Scatchard*-Graphen

Wenn die Tangenten T_0 und T_∞ mit dem *Scatchard*-Graphen zusammenfallen, ist die notwendige Bedingung dafür erfüllt, daß die untersuchte Reaktion dem $P + Q \rightleftharpoons PQ$ -Modell entspricht, d.h., daß die Populationen der Reaktionspartner p und q hinsichtlich der Affinitäten zueinander aus homogenen, unabhängigen Bindungsstellen bestehen. Dann ist nach Gl. 2b, wie vielfach beschrieben,

der Anstieg von T_0 = Anstieg von T_∞ = Anstieg des *Scatchard*-Graphen = $-K$,

der Abszissenabschnitt von T_0 = Abszissenabschnitt von T_∞ = Abszissenabschnitt des *Scatchard*-Graphen $r = 1$ bzw. $B = q$ und

der Ordinatenabschnitt T_0 = Ordinatenabschnitt T_∞ = Ordinatenabschnitt des *Scatchard*-Graphen = K .

Linearität des *Scatchard*-Graphen kann jedoch u. U. auch auftreten, wenn in einer heterogenen Rezeptor-Population die Liganden-Affinität breit um eine mittlere Affinität gestreut ist. Der Ordinaten-Abschnitt entspricht dann der mittleren Assoziationskonstante \bar{K} (18).

2. Auswertung nicht-linearer *Scatchard*-Graphen

A) Mißklassifikationen

Bevor andere Ursachen der Nicht-Linearität des *Scatchard*-Graphen diskutiert werden, muß sichergestellt sein, daß die Meßwerte tatsächlich Gleichgewichtskonzentrationen repräsentieren. Abweichungen von diesen Voraussetzungen kommen relativ häufig vor, z. B. auch als Ursache des „hook-Effektes“, der mit positiver Kooperation verwechselt werden kann. B wird nach Verlusten (z. B. Adsorption, Zersetzung von Binder oder Komplex) zu niedrig oder nach Verunreinigung mit F (z. B. Co-Präzipitation) zu hoch bestimmt. Häufig wird der unbesetzte Rezeptor schneller zersetzt als seine komplexierte Form. Die zur Einstellung des Reaktions-Gleichgewichtes ermittelte Zeit muß nicht notwendig auch für Ansätze mit anderer Konzentration der Reaktionspartner gültig sein (12, 14, 19–21).

B) Abweichung vom Modell $P + Q \rightleftharpoons PQ$

Wegen der Äquivalenz von P und Q wirken sich Abweichungen von der Univalenz, Homogenität, Unabhängigkeit der Bindungsstellen von Ligand und Rezeptor gleichartig aus. Die prinzipielle Austauschbarkeit beider Größen wird nur dadurch eingeschränkt, daß z. B. der markierte Ligand als Meßgröße dient und nicht der Rezeptor. Der Ligand wird als Reagenz ausgewählt, es kann jedoch nicht immer davon ausgegangen werden, daß der zur Rezeptoranalytik eingesetzte Ligand ebenso gut charakterisiert ist wie andere „p.A.-Reagenzien“.

Systeme, deren Heterogenität mit n Klassen unabhängiger Bindungsstellen des Liganden,

$$p = \sum_{i=1}^n p_i \quad (i = 1, 2, \dots, n),$$

und mit m Klassen unabhängiger Bindungsstellen des Rezeptors,

$$q = \sum_{j=1}^m q_j \quad (j = 1, 2, \dots, m),$$

definiert werden kann, werden durch einen Satz von Gleichungen (Gl. 2b') beschrieben, in denen Gl. 2b als Spezialfall ($n = 1, m = 1$) enthalten ist (22).

$$\frac{B_i}{F_i} = \sum_{j=1}^m \frac{K_{ij} q_j}{1 + \sum_{a=1}^n K_{aj} F_a} \quad (\text{Gl. 2b'})$$

a) Heterogenität des Liganden

Absichtlich wird die Heterogenität der Liganden in den „Kompetitionsverfahren“ der Rezeptoranalytik eingesetzt, wenn der zur leichteren Meßbarkeit besonders „markierte“ Ligand p^* sich im Reaktionsansatz aufgrund seiner Markierung oder seiner geringen Menge anders verhält als nur als Ligand des zu analysierenden Rezeptors q (1, 6, 14, 23). Es wird dann versucht, diese „unspezifischen“ Effekte dadurch zu eliminieren, daß die „spezifische“ Bindung des markierten Liganden durch Zusatz steigender Mengen des unmarkierten Liganden gehemmt wird, bis nur die „unspezifische“ Bindung übrig bleibt. In dieser Form der Bindungsanalysen wird jetzt $p_{\text{tot}} = p^* + p$ und $q = Q + P^*Q + PQ$ (bei konstantem p^* variiert die spezifische Aktivität der variablen Dosis p). Wenn markierter und unmarkierter Ligand gleiche Affinität zum Rezeptor aufweisen ($K^* = K$), resultiert daraus ein linearer *Scatchard*-Graph mit dem Anstieg $-K^* = -K$ und dem Abszissenabschnitt q , unabhängig davon, wie groß p^* gewählt wurde. Wenn die Affinitäten von markiertem und unmarkiertem Ligand differieren, resultiert daraus bei $K^* > K$ ein nach unten, bei $K^* < K$ ein nach oben durchgebogener *Scatchard*-

Graph, dessen Anstieg und Abszissenabschnitt u.a. von der eingesetzten Menge p^* abhängt. Zum Ausschluß der Hypothese $K^* \neq K$ werden Rezeptoranalysen als Kompetitionenverfahren angesetzt, und zwar in mehreren Serien mit unterschiedlichen Mengen von p^* (z.B. $1/10 p^*$, p^* , $10 p^*$). Kompetitionenverfahren werden auch dann eingesetzt, wenn die spezifische Aktivität von p^* ermittelt werden soll. Dies und die Prüfung der Hypothese $K \neq K^*$ ist besonders dann zu empfehlen, wenn Liganden eingesetzt werden, die mit Heteroatomen, wie z.B. ^{125}I markiert sind (24–28).

Heterogenität des Liganden kann auch unbeabsichtigt auftreten, sei es durch die Markierung, z.B. können bei 4 Tyrosin/Molekül (Insulin) theoretisch 80 I-Derivate entstehen, oder sei es durch Selbst-Aggregation bei höheren Konzentrationen von p (29). Es ist ebenfalls zu beachten, daß der Ligand auch erst während der Inkubation als Folge von Nebenreaktionen heterogen geworden sein kann.

b) Heterogenität des Rezeptors

(Heterogenität präexistent oder durch Bindung induziert)

Wenn per exclusionem die Nicht-Linearität des *Scatchard*-Graphen auf Heterogenität der Bindungsstellen des Rezeptors zurückgeführt worden ist, wird die weitere Präzisierung eines geeigneten Modells davon abhängig gemacht, ob der Graph ein Maximum besitzt oder nicht (1, 2, 3, 15–17, 29).

Ein nach oben gebogener konvexer *Scatchard*-Graph („concave down“) mit einem Maximum (negative 2. Ableitung) kann bekanntlich als Folge positiver Kooperativität der Bindungsstellen entstanden sein. Aus der Lage des Maximums kann auf das Ausmaß der positiven Kooperativität geschlossen werden; für weitergehende Aussagen wird empfohlen, die Meßwerte in ein *Sips-Hill*-Diagramm einzusetzen (17, 29).

Ein nach unten gebogener konkaver *Scatchard*-Graph („concave upward“) kann als Folge negativer Kooperativität und/oder als Folge praexistenter Heterogenität mit diskreter oder kontinuierlicher Verteilung der Bindungsenergien entstanden sein. Weitergehende Schlüsse über den molekularen Mechanismus der Bindungsreaktion können aus dem Verlauf des *Scatchard*-Graphen allein nicht gefolgert werden.

Systeme mit praexistenter und/oder induzierter Heterogenität der Rezeptor-Bindungsstellen werden im allgemeinen durch die *Adair*-Funktion (Gl. 2a') beschrieben, die Gl. 2a als Spezialfall ($j = 1$, $\psi = K$) enthält (1–4, 15–17, 29).

$$r = \frac{\sum_{j=1}^m j \psi_j F^j}{1 + \sum_{j=1}^m \psi_j F^j} \quad (\text{Gl. 2a'})$$

Aus Gl. 2a' wird $\frac{d(r/F)}{dr}$ abgeleitet, und damit werden auch die Parameter der Tangenten T_0 und T_∞ im *Scatchard*-Diagramm gewonnen (Abb. 2).

Die numerischen Werte für die *Adair*-Konstanten ψ_j , für die phänomenologischen Konstanten zur Beschreibung der Bindung des j^{ten} Liganden, können aus den Anstiegen, Ordinaten- und Abszissenabschnitten der Tangenten T_0 und T_∞ gewonnen werden. Ihre Interpretation als Terme, zusammengesetzt aus makroskopischen (molekularen, stöchiometrischen, Titrations-) und mikroskopischen (Bindungsstellen-) Assoziationskonstanten, aus statistischen Faktoren, aus Koeffizienten der Variation und Indices der Heterogenität zur Beschreibung der Dispersion eines Affinitäts-Spektrums u. a., ist vom unterlegten Modell abhängig. Die korrekte Konstruktion der Tangenten und der richtige Zusammenhang zwischen den Parametern der Tangenten und der möglichen reaktionsmechanistischen Deutung der *Adair*-Konstanten ist mehrfach beschrieben worden (1–5, 14–17, 29); trotzdem kommt es, selbst in Publikationen renommierter Zeitschriften, häufig zu falschen Konstruktionen und Interpretationen (30). Besonders oft wird der Anstieg von T_0 fälschlich als Wert der Assoziationskonstanten ($-K_1$) und der zugehörige Abszissenabschnitt fälschlich als Wert der Menge q_1 der Bindungsgruppe mit der stärksten Affinität bezeichnet sowie der Anstieg von T_∞ fälschlich als $-K_m$ der Bindungsgruppe q_m mit der schwächsten Affinität bezeichnet.

Ein ebenfalls als „unspezifische Bindung“ ($\text{NSB}_{\text{graph}}$) bezeichneter Anteil an den Meßwerten für B kann graphisch über $\lim_{B \rightarrow \infty} r/F = \text{NSB}_{\text{graph}}$ eliminiert werden

(14, 31, 32). Diese Annahme einer Asymptote parallel zur x-Achse läßt sich nach Gl. 2b' ableiten:

$$n = 1; m;$$

$$\frac{B}{F} = \frac{K_1 q_1}{1 + K_1 F} + \dots + \frac{K_m q_m}{1 + K_m F};$$

$$K_m \ll q_m: \frac{K_m q_m}{1 + K_m F} = K_m q_m = \text{const.}$$

Es empfiehlt sich aber, die „unspezifische Bindung“ auch experimentell zu bestimmen, d.h. Bindungskurven von p^* mit und ohne Zusatz von überschüssigem unmarkierten Liganden p zu erstellen und die so ermittelten Differenzen als Funktion von p^* aufzutragen. Wenn eine lineare Beziehung nachzuweisen ist, sind die Funktionswerte der unspezifischen Bindung (NSB_{exp}) besser als Korrekturglied der „korrigierten“ *Scatchard*-Funktion

$$\frac{B_{\text{tot}} - \text{NSB}_{\text{exp}}}{T - B_{\text{tot}}} = f(B_{\text{tot}} - \text{NSB}_{\text{exp}})$$

CK(NAC)

CK-MB(NAC)

Ein Prinzip setzt sich durch!

Nicht jede

RIA-Bestimmung
bedarf eines kommerziellen Kits!

Der Trend geht zu Eigenansätzen, die Qualitätsvergleichen durchaus standhalten, jedoch wesentlich kostengünstiger sind.

Mit **Antiseren**, deren bekannte Kreuzreaktionen klare klinische Aussagen zulassen, haben Sie endlich wieder Spielraum für notwendige Anschaffungen.

z. B.
Steroidantiseren

1 000 Bestimmungen DM 400,-
5 000 Bestimmungen DM 1600,-

Was Sie sonst noch benötigen, ist zu ähnlich günstigen Bedingungen erhältlich.

Bezug und weitere Information durch

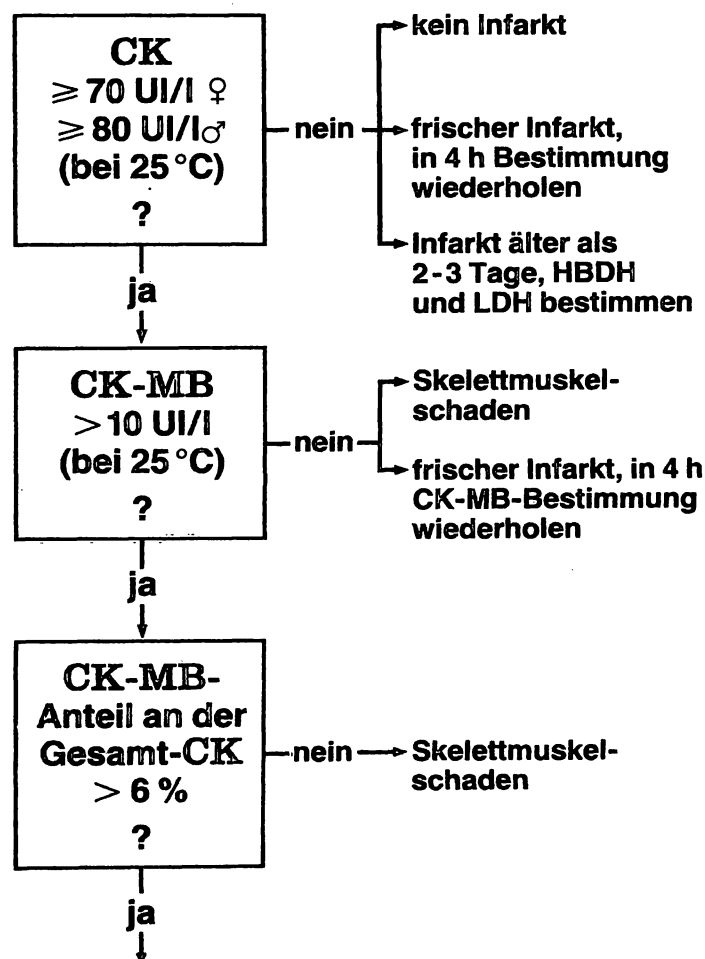
panchem
ges.f.chemische produkte mbh
Schloßstraße 3 D-8751 Kleinwallstadt
Postfach 50 Tel. 06022/21005
Telex 04188144 panc-d

Österreich:

Medizin-Labortechnik Michael Politakis,
Dr-Stumpf-Str. 55 · A-6010 Innsbruck

Der immunologische CK-MB-Test hat als schnelle und sichere Routinemethode zur Differenzierung zwischen Myokard- und Skelettmuskelschäden weltweit seine Bestätigung gefunden.

Bei Verdacht auf Myokardschaden CK(NAC) und CK-MB(NAC) anfordern



Myokardschaden

Ausführliche Unterlagen senden wir Ihnen auf Wunsch gerne zu.

E. Merck, V Diag W
Frankfurter Straße 250
D-6100 Darmstadt 1



Walter de Gruyter
Berlin · New York

Wolfgang Voelter
Günter Weitzel
(Editors)

Structure and Activity of Natural Peptides **Selected Topics**

Proceedings of the Fall Meeting
Gesellschaft für Biologische Chemie
Tübingen, Germany, September 1979

1981. 17 cm × 24 cm. XII, 648 pages. Numerous illustrations.
Hardcover. DM 150,—; approx. US \$ 83.50
ISBN 3 11 008264 0

This volume is the result of selected contributions presented
at the Fall Meeting of the Gesellschaft für Biologische Chemie
in Tübingen in 1979.

CONTENTS (main chapters):

- I. Surveys of Selected Topics. II. Isolation of New Peptides.
III. Methods of Purification, Isolation and Characterization of Peptides.
IV. Peptide Syntheses. V. Miscellaneous and Biological Activity of Peptides

Das Kreiskrankenhaus Bergstraße
in Heppenheim
— Inbetriebnahme 1. Juli 1982 —

sucht

zum nächstmöglichen Einstellungstermin

- 1 Chemiker (Laborleiter)/**
1 Leitende med. techn. Assistentin (Labor)

Das Kreiskrankenhaus
verfügt über 373 Planbetten für die Bereiche
Innere Medizin I und II
Chirurgie
Orthopädie
Gynäkologie

Bewerbungen mit den üblichen Unterlagen sind
zu richten an das

Kreiskrankenhaus Bergstraße
Viernheimer Straße 2
6148 Heppenheim



Walter de Gruyter
Berlin · New York

E. Buddecke

Biochemische **Grundlagen** **der Zahnmedizin**

17 cm × 24 cm. XV, 193 Seiten. 90 Abbildungen.
19 Tabellen. 1981. Flexibler Einband. DM 36,—
ISBN 3 11 008738 3

Das Kurzlehrbuch für Zahnärzte und Studierende
behandelt die Biochemie der Zähne, des
Zahnhalteapparates und der Mundhöhle. Es werden
Chemie und Stoffwechsel der organischen Matrix
der Zahnhartsubstanz, Biomineralisation,
Fluoridstoffwechsel und die spezielle Biochemie
des Speichels und der Mikroorganismen der
Mundhöhle beschrieben. Sie bilden die Grundlage für
die Pathobiochemie der beiden häufigsten
Erkrankungen der Odontologie — der Karies und der
Parodontopathie. Die Darstellung umfaßt neben
pathogenetischen auch präventive Aspekte der Karies
und Parodontopathie sowie eine Übersicht über die
chemische Zusammensetzung und Wirkungsweise
von Zahnpflegemitteln.

Der behandelte Inhalt des Buches berücksichtigt
auch die Prüfungsordnung für Zahnärzte.

Preisänderungen vorbehalten

geeignet als die Einzelwerte oder gemittelten Einzelwerte der unspezifischen Bindung. Aber auch diese Methode der experimentellen Ermittlung von NSB ist nicht unproblematisch, insbesondere, wenn die als p eingesetzte Substanz sich von p^* nicht nur durch die Radioaktivität unterscheidet. Andere Verfahren zur experimentellen Bestimmung von NSB wie z.B. die über Hitze-Inaktivierung der Rezeptoren sind ebenfalls nicht unproblematisch. Auf die alternative Möglichkeit, die spezifische Rezeptorbindung B_{spez} dadurch zu bestimmen, daß der Effekt E spezifischer Folgereaktionen gemessen wird $E = f(B_{spez})$, sei ebenfalls hingewiesen (14, 23, 33–35).

Die prinzipiellen Schwächen der graphischen Methoden zur Bestimmung der Parameter der Liganden-Bindung durch Rezeptoren liegen darin begründet, daß, von der „unspezifischen“ Bindung abgesehen, nicht mehr als vier Parameter eines Systems bestimmt werden können (z.B. K_{i1} , K_{im} ; q_1 , q_m) und daß zur Konstruktion der Tangenten T_0 und T_∞ ausgerechnet die Regionen des Scatchard-Graphen herangezogen werden müssen, die nur mit großer Unsicherheit bestimmt werden können ($r < 0,1$ bzw. $> 0,9$). Schließlich läßt sich Subjektivität beim Konstruieren der Tangenten nicht ausschließen und die Definition eines Vertrauensbereiches der Parameter kaum verwirklichen.

Mit Hilfe der modernen Möglichkeiten der Datenverarbeitung können die Parameter beliebiger mathematisch-statistischer Funktionen so variiert werden, daß sie sich sämtlichen Meßpunkten der Rezeptoranalyse optimal anpassen. Damit besteht die Möglichkeit, den gesamten Meßbereich zu nutzen, um für Systeme beliebiger Komplexität Lösungen zu finden (Abb. 3). Wenn aber, wie bereits erwähnt, mindestens 10 Meßpunkte erforderlich sind, um eine zuverlässige Anpassung einer Geradengleichung mit zwei unbekannten Parametern (K , q) zu gewährleisten, und wenn andererseits die Anzahl sinnvoller Meßpunkte N durch $N_{max} = 1/2 s_r$ begrenzt ist, wird es offensichtlich, daß auch mit Hilfe der elektronischen

Datenverarbeitung selten Zahlenwerte für mehr als 5 Parameter ermittelt werden können, für die über 25 Meßpunkte gefordert werden (1). Es muß betont werden, daß auch die elektronische Datenverarbeitung die Information *nicht produziert, sondern* aus den Meßwerten *extrahiert*. Die Subjektivität oder Willkür kann auch mit elektronischer Datenverarbeitung Eingang in die Rezeptoranalytik finden, wenn nicht die optimale Parameter-Anpassung an die Meßdaten adäquat definiert und getestet wurde (35–37). In Abb. 3 sind neben Beispielen idealer Parameteranpassung auch die wichtigsten Abweichungen vom idealen „fit“ dargestellt. Die entsprechenden Diagnosen wurden dadurch der Willkür entzogen, daß reale Meßdaten geeigneten Prüfprogrammen unterworfen wurden (36).

Zur Interpretation der vom Rechner aufbereiteten Information ist es notwendig, sich u.a. mit den Theorien der Reaktionskinetik, wie auch mit den Theorien der optimalen Parameter-Anpassung auseinander zu setzen, um z.B. die Plausibilität des Reaktionsmodells abzuwägen, und um zu prüfen, wie weit z.B. Normalverteilung und Homoscedastizität der Meßfehler vorausgesetzt wird (1, 4, 7, 22, 31, 35–37). Die vorherige kritische graphische Auswertung der Meßwerte am eigenen Arbeitsplatz fördert nicht nur die unmittelbare Einsicht in die Problematik der Rezeptoranalytik, sie ist auch hilfreich, um die initialen Parameter für die Iterationsverfahren des Rechners bereitzustellen. Auch wenn die Möglichkeit gegeben ist, mit Hilfe vorgegebener Programme die Daten der Rezeptoranalysen außerhalb des Laboratoriums auszuwerten bzw. auswerten zu lassen, sollte das Labor also über ein Basiswissen hinsichtlich der mathematischen Grundzüge der Assoziationsreaktionen verfügen, dessen Umfeld hier abgesteckt werden sollte. Das Lesen dieses Beitrags kann und soll das Studium der (ausnahmsweise und beabsichtigt mit Titel) aufgeführten Übersichten und Originalarbeiten nicht ersetzen, es kann und soll aber dazu beitragen, Probleme der Praxis zu erkennen und so die jetzt

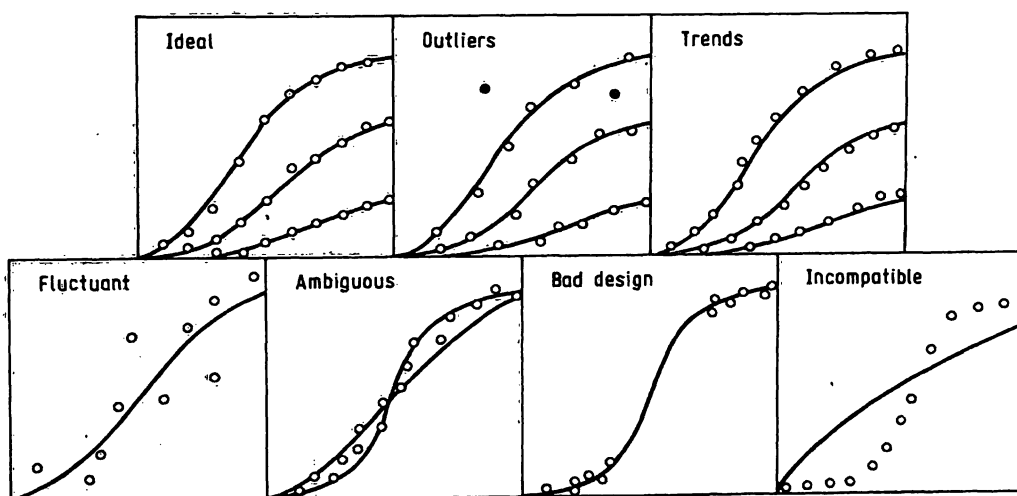


Abb. 3. Tests auf Passung und Beispiele unbefriedigender Passung zwischen den Parametern von theoretischem Modell und realem System (aus l.c. (36)).

noch so zahlreiche publizierten Verstöße gegen mathematisch-statistische Regeln in der Rezeptoranalytik zu vermindern (30). Der Ausspruch „There is nothing more

practical than a good theory“ (Leonid Breshnew, zit. nach l.c. (38) kann auch auf die Laborpraxis der Rezeptoranalytik bezogen werden.

Literatur

- Rodbard, D. (1973) Mathematics of hormone-receptor interaction: I. Basic principles.
- Rodbard, D. & Bertino, R. E. (1973) Theory of radioimmunoassays and hormone-receptor interactions: II. Simulation of antibody divalency, cooperativity and allosteric effects. In: Receptors for reproductive hormones (O'Malley, B. W. & Means, A. R., eds.) New York: Plenum Press, pp. 289–341. (Advanc. Exp. Med. Biol., Vol. 36).
- Winkler-Oswatitsch, R. & Eigen, M. (1979) Die Kunst zu Titrieren. Vom klassischen Endpunktverfahren zur modernen differentiellen und dynamischen Analyse. Angew. Chem. 91, 20–51.
- Weber, G. & Anderson, S. R. (1965) Multiplicity of binding. Range of validity and practical test of Adair's Equation. Biochemistry 4, 1942–1947.
- Deranleau, D. A. (1969) Theory of the measurement of weak molecular complexes: I. General considerations. II. Consequences of multiple equilibria. J. Amer. Chem. Soc. 91, 4044–4054.
- Buller, R. E., Schrader, W. T. & O'Malley, B. W. (1976) Steroids and the practical aspects of performing binding studies. J. Steroid Biochem. 7, 321–326.
- Cuatrecasas, P. & Hollenberg, M. D. (1976) Membrane receptors and hormone action. In: Advances in protein chemistry (Anfinsen, C. B., Edsall, J. T. & Richards, F. M., eds.) Vol. 30. New York: Academic Press, pp. 251–428.
- Weder, H. G., Schildknecht, J., Lutz, R. A. & Kesselring, P. (1974) Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical considerations. Eur. J. Biochem. 42, 475–481.
- Atkins, G. L. & Nimmo, I. A. (1980) Current trends in the estimation of Michaelis-Menten Parameters. Anal. Biochem. 104, 1–9.
- Thakur, A. K. & Rodbard, D. (1979) Graphical aids to interpretation of Scatchard plots and dose-response curves. J. Theor. Biol. 80, 383–403.
- Cressie, N. A. C. & Keightley, D. D. (1979) The underlying structure of the direct linear plot with application to the analysis of hormone-receptor interactions. J. Steroid Biochem. 11, 1173–1180.
- Keightley, D. D. & Cressie, N. A. C. (1980) The Woolf plot is more reliable than the Scatchard plot in analysing data from hormone receptor assays. J. Steroid Biochem. 13, 1317–1323.
- Nimmo, I. A., Atkins, G. L., Strange, R. C. & Percy-Robb, I. W. (1977) An evaluation of ways of using equilibrium dialysis to quantify the binding of ligand to macromolecule. Biochem. J. 165, 107–110.
- Woosley, J. T. & Muldoon, T. G. (1977) Comparison of the accuracy of the Scatchard, Lineweaver-Burk and direct linear plots for the analysis of steroid-protein interactions. J. Steroid Biochem. 8, 625–629.
- Braunsberg, H. & Hammond, K. D. (1980) Practical and theoretical aspects in the analysis of steroid receptors. J. Steroid Biochem. 13, 1133–1145.
- Klotz, I. M. & Hunston, D. L. (1971) Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. Biochemistry 10, 3065–3069.
- Henis, Y. I. & Levitzki, A. (1976) An analysis on the slope of Scatchard plots. Eur. J. Biochem. 71, 529–532.
- Dahlquist, F. W. (1978) The meaning of Scatchard and Hill plots. Meth. Enzymol. 48, Enzyme structure, pt. F, pp. 270–299.
- Minton, A. P. (1979) On the interpretation of binding isotherms in complex biological systems. Apparent homogeneity of some heterogeneous systems. Biochim. Biophys. Acta 558, 179–186.
- Swillens, St. & Dumont, J. E. (1975) A pitfall in the interpretation of data on ligand-protein interaction. Biochem. J. 149, 779–782.
- Saiduddin, S. & Zassenhaus, H. P. (1978) Further consideration of systematic errors present in protein-ligand interactions. Steroids 32, 51–59.
- Borth, R. (1980) Mass-action model for radioimmunoassays and other saturation assays with atypical performance characteristics. Math. Biosci. 51, 187–197.
- Feldman, H. A. (1972) Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: Some methods for parameter fitting. Anal. Biochem. 48, 317–338.
- Cuatrecasas, P. & Hollenberg, M. D. (1975) Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: Saturability, specificity and apparent “negative cooperativity”. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 31–41.
- Akera, T. & Cheng, V.-J. K. (1977) A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies. Biochim. Biophys. Acta 470, 412–423.
- Walker, W. H. C. (1977) An approach to immunoassay. Clin. Chem. 23, 384–402.
- Taylor, S. I. (1975) Binding of hormones to receptors. An alternative explanation of nonlinear Scatchard plots. Biochemistry 14, 2357–2361.
- Hollemans, H. J. G. & Bertina, R. M. (1975) Scatchard plot and heterogeneity in binding affinity of labeled and unlabeled ligand. Clin. Chem. 21, 1769–1773.
- Verhoff, F. H., Lisi, P. J., Fischer, C. D., Teipel, J. W., Goldstein, G. & Schiffman, M. B. (1980) Graphical determination of specific activity, binding constants, and antibody-site concentrations for radioimmunoassays, with application to thymopoietin. Clin. Chem. 26, 718–723.
- Thakur, A. K., Jaffe, M. L. & Rodbard, D. (1980) Graphical analysis of ligand-binding systems: Evaluation by Monte Carlo Studies. Anal. Biochem. 107, 279–295.
- Nørby, J. G., Ottolenghi, P. & Jensen, J. (1980) Scatchard plot: Common misinterpretation of binding experiments. Anal. Biochem. 102, 318–320.
- Schwarz, S. (1979) A simple computer program for Scatchard plot analysis of steroid receptors including non-specific binding correction on a low cost desk top calculator. J. Steroid Biochem. 11, 1641–1646.
- Braunsberg, H. & Hammond, K. D. (1979) Methods of steroid receptor calculation: An interlaboratory study. J. Steroid Biochem. 11, 1561–1565.
- Strickland, S. & Loeb, J. N. (1981) Obligatory separation of hormone binding and biological response curves in systems dependent upon secondary mediators of hormone action. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1366–1370.
- Tallarida, R. J. (1981) Theoretical pharmacology: the quantitative identification of receptors. Trends Pharmacol. Sci. (TIPS) 2, 231–234.
- Rodbard, D., Munson, P. J. & Thakur, A. K. (1980) Quantitative characterization of hormone receptors. Cancer 46, 2907–2918.
- Reich, J. G., Wangermann, G., Falck, M. & Rohde, K. (1972) A general strategy for parameter estimation from isosteric and allosteric-kinetic data and binding measurements. Eur. J. Biochem. 26, 368–379.
- Atkins, G. L. (1976) Tests for the goodness of fit of models. Biochem. Soc. Transaction 4, 357–361.
- Rich, V. (1977) Following a Maoist path. Nature 270, 470–471.

Prof. Dr. Dr. Erich Kuss
I. Frauenklinik der Universität
Maistr. 11
D-8000 München 2